

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**PRODUÇÃO DE MUDAS DE TIMBAÚVA INOCULADAS COM
FUNGOS MICORRÍZICOS EM SOLO COM REJEITO DE CARVÃO
MINERAL**

DERLINE DIMANCHE

FLORIANÓPOLIS, NOVEMBRO DE 2015

DERLINE DIMANCHE

PRODUÇÃO DE MUDAS DE TIMBAÚVA INOCULADAS COM
FUNGOS MICORRÍZICOS EM SOLO COM REJEITO DE CARVÃO
MINERAL

Relatório de Estágio de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Paulo Emílio Lovato.

Supervisor: Doutorando Marcos Leandro dos Santos.

Florianópolis – SC

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar aqui, pelas forças que me deu para continuar mesmo em momentos difíceis até chegar a esta fase.

À minha mãe querida, Ste Anne Myrtil, pelo seu amor, seus exemplos e suas orações.

Aos meus irmãos pelo amor, conselhos e apoios.

Ao meu namorado, Romial Bertrand, pela companhia nos momentos bons e ruins, sua compreensão e seus conselhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato pelas orientações no trabalho e pelo apoio.

Ao meu supervisor, Doutorando Marcos Leandro dos Santos, pelos ensinamentos, orientações e apoio na realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Agronomia/CCA-UFSC, pelos ensinamentos, orientações e amizades.

Aos membros da banca examinadora, Professor Arcângelo Loss, Doutorando Marcos Leandro dos Santos, pela contribuição e orientação no trabalho.

Aos amigos, Merlange Jn Batiste, Jucal Belval, Mari Hernandez, Anitha Hernandez.

Às demais pessoas, que de alguma forma contribuem que este sonho fosse concretizado, certamente, vocês fazem parte da minha história.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
3.1. Áreas contaminadas com Metais Pesados (MPs).....	9
3.2. Espécies florestais utilizadas em solos contaminados MPs	12
3.3. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) em associação com plantas vasculares em ambientes contaminados com MPs.....	13
3.4. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio (BFN) associadas com plantas leguminosas.....	15
3.5. Efeito da mineração de carvão sobre a micorrização	15
4.OBJETIVOS	16
4.1. Objetivo Geral	16
4.2. Objetivos Específicos.....	16
5. HIPÓTESES.....	16
6. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	17
6.1. Solo, Rejeito e Substratos utilizados no Experimento	17
6.2. Materiais Biológicos utilizados	18
6.3. Montagem e Condução do Experimento	19
6.4. Preparação do Tecido Vegetal para Avaliação	21
6.5. Análise Estatística.....	22
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
8. CONCLUSÃO.....	30
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visualização da drenagem ácida de mina (DAM) (A) e da área degradada pela mineração de carvão no Município de Criciúma / SC (B).....	11
Figura 2. Vista parcial das mudas de timbaúva na casa de vegetação aos 90 dias após a emergência.....	20
Figura 3. Mudas de timbaúva produzidas sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com <i>Acaulospora colombiana</i> (AC) ou <i>Rhizophagus clarus</i> (RC) sob diferentes tratamentos sem rejeito (A) e com rejeito (B) de mineração de carvão aos 90 dias.	20
Figura 4. Vista da lâmina contendo raízes de timbaúva após a coloração.	21
Figura 5. Porcentagem da colonização micorrizica em mudas de timbaúva inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> (<i>R. clarus</i>) ou <i>Acaulospora colombiana</i> (<i>A. colombiana</i>) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.	25
Figura 6. Número de nódulos em mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> (<i>R. clarus</i>) ou <i>Acaulospora colombiana</i> (<i>A. colombiana</i>) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.....	26
Figura 7. Peso seco dos nódulos em mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> (<i>R. clarus</i>) ou <i>Acaulospora colombiana</i> (<i>A. colombiana</i>) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.....	27
Figura 8. Índice SPAD de mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> (<i>R. clarus</i>) ou <i>Acaulospora colombiana</i> (<i>A. colombiana</i>) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização física e química dos substratos sem rejeito (SR) e com rejeito (CR), coletados em área de mineração para a produção de mudas de timbaúva após a autoclavagem e adição da dose de fósforo recomendada..... 18

Tabela 2 - Diâmetro do caule (DC); massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca da raiz (MSR); massa seca total (MST) e índice de qualidade de diskson (IQD) de mudas de timbaúva sem inoculação de fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (SR) de mineração de carvão..... 22

Tabela 3. Teores de N, P na massa seca da parte aérea (MSPA) de mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas 90 dias. 29

RESUMO

O estágio de conclusão de curso foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias-CCA/UFSC. A revegetação pelas espécies florestais inoculadas com fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) e bactérias diazotróficas (*Bradyrhizobium elkanii*) pode ser uma alternativa para diminuir o impacto da contaminação de carvão mineral no solo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e a qualidade das mudas de timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) inoculadas com FMAs e bactéria diazotrófica em substrato sem e com rejeito da mineração de carvão. O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante 90 dias, em um delineamento inteiramente casualizado, com doze repetições, e seis tratamentos (sem fungo, inoculado com *Rhizophagus clarus* ou com *Acaulospora colombiana*) em substrato sem e com rejeito (30%) da mineração de carvão. As unidades experimentais foram tubetes de 300 cm³ preenchidos com: solo + rejeito + areia na proporção de 7:3:1 (solo com rejeito) ou 7:1 (solo sem rejeito). As variáveis avaliadas foram: altura; diâmetro do caule; massa seca da parte aérea; massa seca da raiz; Índice de Qualidade de Dickson (IQD); porcentagem da colonização micorrizica; número dos nódulos; peso seco dos nódulos; índice de SPAD; teor de N e P na parte aérea das mudas. Os resultados indicaram que a inoculação das mudas com *Acaulospora colombiana* e a adição de rejeito da mineração de carvão proporcionaram os melhores resultados no crescimento, na qualidade e no teor de N na parte aérea das mudas de timbaúva em relação aos demais tratamentos. O *Rhizophagus clarus* e o rejeito da mineração de carvão proporcionaram maiores benefícios a qualidade e a absorção do teor de P na parte aérea das mudas de Timbaúva.

Palavras-chaves: Revegetação. Espécies florestais. Contaminação por carvão mineral.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho é o relatório de estágio de conclusão de curso de Agronomia, realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo, no tema de recuperação de áreas degradadas, no qual buscou-se uma atuação acadêmica nas pesquisas e nas práticas. O estágio proporcionou aprendizagem em nível técnico e profissional relacionado ao tema desenvolvido.

O local das atividades foi o Departamento de Engenharia Rural – ENR do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O estágio foi realizado no período de 7 de Agosto a 27 de Outubro de 2015, sob a coordenação do Prof. Paulo Emílio Lovato e do Aluno de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, M. Sc. Marcos Leandro dos Santos. As atividades desenvolvidas foram baseadas na preparação e na avaliação de amostras da espécie vegetal timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) inoculada com fungos micorrízicos arbusculares, em substrato com e sem rejeito de mineração de carvão. Por meio dessas atividades, foi possível uma aprendizagem na área de microbiologia do solo, principalmente na ecologia do solo e na micorrização de plantas, além do aprendizado na rotina de Laboratório do Solo, onde se efetuaram todas as análises da pesquisa. Foi uma experiência muito valiosa em termos de práticas e de conhecimentos teóricos, no qual proporcionou-se um treinamento profissional mediante manuseio de equipamentos, programas computacionais e metodologias para a execução deste trabalho. Portanto, o estágio possibilitou a aquisição de conhecimento muito relevante na minha formação.

No local do trabalho, coordenado pelo Prof. Paulo Emílio Lovato, doutorandos, mestrandos e alunos da graduação desenvolvem atividades como estágios, trabalhos científicos, sobretudo, pesquisas na área de microbiologia e de fertilidade de solos. Nesse espaço, há uma convivência entre alunos de diversos níveis de estudos, com isso, é considerado um ambiente apropriado para a realização de atividades de caráter científico, especialmente, nas áreas mencionadas. Dessa forma, o local contribui na divulgação de pesquisas, ao mesmo tempo, na capacitação de pessoas na comunidade acadêmica.

2. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO

O Laboratório está localizado no prédio da ENR – CCA – UFSC, na Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis - SC – Brasil.

Em termos de infraestrutura, atualmente o Laboratório conta com 3 microscópios ópticos e 2 esteromicroscópios, câmara de fluxo laminar, balança de precisão, Centrífuga, 2 Geladeiras, Freezer, Agitador Magnético, Forno de Microondas, Estufa de secagem, Estufa de cultivo 2 Autoclaves. Além desses, o Laboratório conta equipamentos do Laboratório de Solos, como Espectrofotômetro para determinação de fósforo (P), capela para digestão de tecido, fotômetro de chama, destilador micro-Kjeldhal para determinação de nitrogênio (N) e armários para armazenamento de amostras. Os equipamentos atendem semestralmente a um público de cerca de 90 estudantes e profissionais para os cursos de graduação em Agronomia, Zootecnia, além dos programas de mestrado e doutorado em Agroecossistemas e Recursos Genéticos Vegetais.

A finalidade principal do Laboratório de Microbiologia do Solo é desenvolver pesquisas nas áreas da Microbiologia e Fertilidade do Solo, possibilitar aulas práticas para discentes dos cursos de Agronomia e de Zootecnia, oferecer oportunidade de estágio aos alunos da graduação dos cursos pré citados, participando nas pesquisas do mestrado e doutorado, assim, viabilizando as atividades de pesquisa e de extensão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Áreas contaminadas com Metais Pesados (MPs)

A contaminação de uma área com metais pesados (MPs) é definida pela presença de um ou mais elementos minerais em concentração superior ao que se encontra na natureza ou os níveis definidos como referência para a região em que insere-se tal área (LU et al., 2012a; PIERZYNSKI et al., 2005). Os MPs são, por definição, constituintes naturais de minerais primários, que, naturalmente, ocorrem no solo em baixas concentrações e/ou em formas pouco disponíveis, sem causar riscos a humanos, animais e plantas (LU et al., 2012a; ZHAO et al., 2007). Essa concentração varia com o material de origem e com os processos de formação do solo (BURAK et al., 2010). Porém, atividades antropogênicas, independentemente da fonte, podem, muitas vezes, levar a concentrações superiores à observada naturalmente ou aos níveis definidos como referência para uma determinada região (LU et al., 2012a).

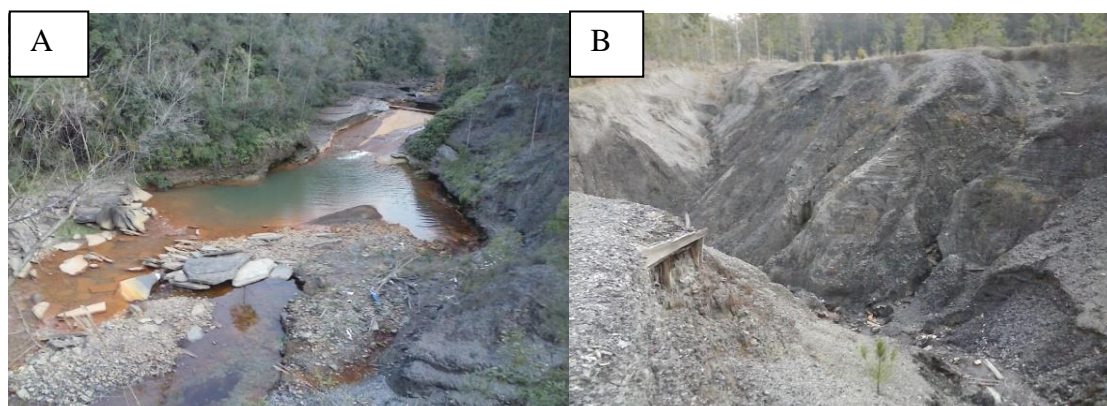
Neste texto, o termo “metal pesado” se refere a um grupo de elementos químicos heterogêneos, ou seja, metais e semi-metais. Embora não exista uma definição por entidade científica para esse termo, ele é muito utilizado na literatura científica (BURAK et al., 2010), por se referir ao grupo de elementos classificados como tóxicos, poluentes e contaminantes do ar, água, solo e alimentos (AMARAL SOBRINHO, 1993). Para alguns autores, metais

considerados como micronutrientes essenciais para as plantas, são chamados metais traços, como: ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu), boro (B), molibdênio (Mo) e níquel (Ni). Por outro lado, cobalto (Co), cromo (Cr), selênio (Se) e estanho (Sn) não são exigidos pelas plantas, mesmo sendo essenciais para os animais (STEVENSON e COLE, 1999). Segundo Alloway (1990), os elementos como arsênio (As), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) não são requeridos nem por animais nem por plantas, por isso, são os mais estudados por serem potencialmente perigosos para as plantas, animais e microrganismos.

O controle da dinâmica de metais introduzidos no ambiente depende de suas características intrínsecas (VEGA et al., 2009). Dentre as propriedades do solo que afetam a retenção, a mobilidade e a disponibilidade de metais pesados, estão pH, Capacidade de Troca Cationica (CTC), teor de matéria orgânica, quantidade e tipo de mineral da fração argila (MATOS et al., 2001). No Brasil, foram realizados alguns levantamentos sobre os teores de metais pesados e de contaminantes em solos, mas ainda não foram definidos níveis de referência para avaliação de contaminação, com a exceção do estado de São Paulo, que estabeleceu critérios de avaliação de contaminação de solo e das águas subterrâneas (CETESB, 2001; FADIGAS et al., 2002). Diversas pesquisas mostram aumento mais significativo das atividades antropogênicas com potencial de elevar o nível de metais no solo e na água subterrânea. Uma delas é a exploração de carvão de origem fóssil, em razão do volume de resíduo gerado e ao nível de toxidez que possui (DNPM, 2012). Este fato já foi comprovado no sul do país, onde ocorre exploração excessiva deste recurso. Especialmente em Santa Catarina (SC), essa atividade já atingiu cerca de 6.700 hectares, e o resíduo gerado é depositado na maior parte, em ambiente inadequado, causando grave impacto ambiental e comprometendo a qualidade dos recursos hídricos e do solo (BINOTTO et al., 1999). Por isso, o aumento de áreas contaminadas por MPs oriundos da mineração de carvão é cada vez mais preocupante para a população em geral e para a comunidade científica.

Estudos mostram que, para cada 1.000 kg de material minerado são gerados aproximadamente 600 kg de rejeitos estéreis, que são acumulados, geralmente, no entorno da área minerada (NASCIMENTO et al., 2002). Os minerais contidos desse resíduo, em especial os sulfetados, quando expostos ao oxigênio e a umidade, oxidam-se facilmente, gerando outros produtos, entre eles, o ácido sulfúrico, gerando o que é chamado Drenagem Ácida de Mina (DAM) (Figura 1). A DAM contém grande quantidade de sólidos em suspensão e elevado conteúdo de metais dissolvidos, dentre eles, destacam-se Al, Mn, Zn, Fe, Cu, e Pb (SILVA et al., 2013).

Figura 1. Visualização da drenagem ácida de mina (DAM) (A) e da área degradada pela mineração de carvão no Município de Criciúma / SC (B).



O tempo de permanência de MPs no solo pode ser muito demorado e depende do tipo de elemento. Pesquisa realizada por Alloway (1990), em solos contaminados por metais, estima que o tempo de permanência do Cd no solo seja de 380 anos e que para o Pb esse tempo é de 3000 anos.

Técnicas físicas e biológicas são utilizadas em programas de descontaminação de solos. As técnicas físicas são classificadas em duas grandes categorias, *ex-situ* e *in-situ*. Na *ex-situ*, o solo contaminado é removido para ser tratado, dentro ou fora do local, e na *in-situ*, o solo contaminado é remediado sem a necessidade de escavação (KHAN et al., 2000). Essas duas técnicas são muito utilizadas no processo de descontaminação de solos, mas as tecnologias envolvidas perturbam a estrutura do solo, e os tornam um meio infértil para o crescimento de plantas. Também há remoção de toda ou parte da biota do solo, inclusive microrganismos mutualistas, como bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos (WHEELER, 1994).

Mesmo com os limitantes citados, as técnicas biológicas são consideradas mais eficientes e economicamente viáveis. Uma dessas técnicas é a fitorremediação, em que plantas associadas com microrganismos são plantadas em solo contaminado ou degradado para imobilizar, sequestrar ou estabilizar contaminantes perigosos do solo, da água e do ar (PRASAD, 2001; RASKIN et al., 1997; SALT et al., 1998). A fitorremediação pode ser usada para recuperar solos contaminados com elementos orgânicos, como hidrocarbonetos, e inorgânicos, como MPs (CUNNINGHAM et al., 1996). As plantas utilizadas nessa técnica devem possuir características, tais como alta capacidade de crescimento, tolerância a altas concentrações de MPs, sistema radicular denso e devem acumular em sua biomassa elevados teores de MPs extraídos do solo (ANDRADE et al., 2009; MUGOUEI et al., 2011).

O Brasil possui potencial para utilizar essa técnica em programas de recuperação de áreas contaminadas ou degradadas, em razão da sua biodiversidade e de seu clima, que favorecem os processos biológicos de tratamento (MARQUES et al., 2011). Dentre as técnicas de fitorremediação as mais utilizadas são a fitoextração e a fitoestabilização. A fitoestabilização é uma forma de diminuir o risco ambiental causado pela contaminação por MPs; plantas associadas com microrganismos são usadas para estabilizar o elemento contaminante no solo, diminuindo seu potencial de contaminações a animais, seres humanos e aos recursos naturais (WONG, 2003). As raízes das plantas podem contribuir para a precipitação ou para a absorção dos contaminantes metálicos voláteis (PEREIRA et al., 2012), e as plantas a serem utilizadas na fitoestabilização devem ter crescimento rápido e ser fáceis de manter em condições de campo, além de possuir sistemas radiculares densos (SANTIBÁÑEZ et al., 2008). A fitoestabilização geralmente é utilizada após o uso de outro método de remediação, sendo usada para estabilizar baixos níveis de metais presentes no solo (SALT et al., 1995).

Na fitoextração, o elemento tóxico é acumulado no tecido das plantas, onde são imobilizados, impedindo que o metal seja translocado no perfil do solo ou lixiviado para corpos de água. Após o período do tratamento, as plantas devem ser retiradas do local e, dependendo da sua viabilidade econômica, podem ser processadas para a separação do metal ou incineradas, mas o destino das cinzas deve ser bem definido (ALKORTA et al., 2004). A fitoextração tem sido utilizada comercialmente em vários países desenvolvidos, especialmente nos EUA, para a descontaminação de solos (LASAT, 2002). Embora, essa tecnologia seja considerada barata em relação às técnicas convencionais na recuperação de solos contaminados, ela é uma alternativa que exige planejamento detalhado, técnicas adequadas, profissionais qualificados, e ainda devem ser consideradas todas as características ambientais da área contaminada (ALKORTA et al., 2004; GRATÃO et al., 2005). Os mecanismos envolvidos nesta técnica incluem o seqüestro do metal dentro das células das raízes e a ligação dele à matéria orgânica, fenômenos que diminuem sua mobilidade no solo. O sucesso desta técnica depende muito da escolha das espécies vegetais a serem utilizadas.

3.2. Espécies florestais utilizadas em solos contaminados MPs

Algumas espécies arbóreas nativas são de grande interesse para a fitorremediação em programas de recuperação de solos contaminados, em razão de seu potencial para produzir grande quantidade de biomassa e acumular quantidades consideráveis de metais em seus tecidos, fazendo com que esses elementos sejam removidos ou se tornem indisponíveis as plantas e aos animais (GRAZZIOTTI et al., 2003). Essas espécies devem possuir capacidade de crescer e se desenvolver em solos com deficiências nutricionais e devem ter sistemas radiculares profundos (PUNSHON et al., 1996). A

tolerância das plantas florestais a MPs varia de acordo com a espécie e com o elemento contaminante (SOARES et al., 2001).

A timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) é uma espécie leguminosa arbórea, da família Fabacea, nativa do Brasil e presente em várias regiões do país. Ela é conhecida por diferentes nomes comuns, dentre eles “orelha-de-negro”, “orelha-de-macaco”, “timbo” ou “tamboril. A sua semente é protegida dentro de vagens de cor escura, geralmente apresenta dormência, tem rápido crescimento em diversos tipos de solos e seu potencial como fitoextratora na recuperação de áreas degradadas e contaminadas já foi comprovado (ANTONIOLLI et al., 2007). Nesse sentido, suas associações com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas podem contribuir para melhorar seu estabelecimento em solos contaminados por MPs, uma vez que esses microrganismos contribuem no aumento da disponibilidade de nutrientes às plantas, em especial, fósforo (P) e água (COSTA et al., 2012).

Apesar de ser pouco estudada, Trannin et al. (2001) verificaram o potencial de timbaúva, acácia (*Acacia mangium*) e sesbânia (*Sesbania virgata*) em solos contaminados com Pb, Zn, Cd e Cu, concluindo que a timbaúva se destacava como a espécie mais tolerante a esses elementos.

3.3. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) em associação com plantas vasculares em ambientes contaminados com MPs

O termo micorriza, proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank (1885), origina-se dos termos de origem grega, “mico” que significa fungo, e “rhiza” que significa raiz (SOUZA et al., 2006). Assim, é uma associação entre fungos do solo e raízes de plantas vasculares, de caráter simbiótico mutualístico (SANTOS, 2006). Ela pode ser considerada simbiótica pela co-existência dos organismos no mesmo ambiente físico, composto pela raiz e pelo solo, e mutualística porque ambos os simbiontes se beneficiam da associação. Todavia, em ambiente onde não há deficiência de nutrientes e presença de estresses, essa associação quando existe é considerada simbiótica, mas não mutualística. Essa associação pode ser observada quando o fungo produz hifas nas raízes da planta hospedeira com potencial de absorver elementos minerais do solo e transferi-los ao tecido das plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

As micorrizas são classificadas por dois grupos, as ectomicorrizas e as endomicorrizas. Os fungos ectomirrizicos possuem crescimento extracelular, formando um manto de hifas ao redor da raiz da planta. Entre as endomicorrizas predominam os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), caracterizados pelo crescimento intracelular no córtex da raiz, formando estruturas muito ramificadas, cujas hifas podem estender no solo por vários centímetros. A maior parte das micorrizas, cerca de 80%, corresponde a FMAs.

A maioria dos FMAs adquiriu, ao longo do tempo, características e adaptabilidade para coexistirem com raízes de diversas espécies de plantas e em condições edáficas diferentes, aumentando sua importância no sistema solo-planta (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Em geral, essa associação é facultativa para a planta e obrigatória para o fungo, uma vez que os FMAs dependem de produtos fotoassimilados das plantas hospedeiras para realizar sua síntese celular e completar seu ciclo de vida (SMITH e READ, 2008). Por outro lado, em ambiente perturbado ou com deficiência de nutrientes, os FMAs desempenham papel importante na melhoria da qualidade nutricional das plantas, em consequência do aumento da área superficial das raízes, o que faz com que explorem nutrientes e água em maior volume do solo (RAVEN et al., 1996). Além disso, os fungos são capazes de melhorar a aeração do solo, favorecer a adaptação das plantas ao ambiente, em especial, ao estresse abiótico provocado por contaminantes, e podem também favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos benéficos, como os solubilizadores de sulfato e de fosfato (COLODETE et al., 2014; LOCATELLI e LOVATO, 2002; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As plantas terrestres apresentam, em sua maioria, associações micorrízicas já estabelecidas, e essa associação é encontrada em quase todos os lugares do mundo (KISTNER e PARRNISKE, 2002; SMITH e READ, 1997). Diversas espécies de fungos foram estudadas em seu potencial para utilizar em solos contaminados com MPs, e muitas apresentam potencial de sobreviver em tais condições. Esses resultados são muito importantes porque, tais ambientes, geralmente não tem condições favoráveis para desenvolvimento da maioria das espécies vegetais. Em programas de fitorremediação, esses microrganismos simbiotes podem ser utilizados em associação com as plantas para melhorar a condição de desenvolvimento e amenizar diferentes tipos de estresse. Segundo as pesquisas, 23 espécies de FMAs foram encontradas em áreas contaminadas com arsênico (As) e as mais representativas foram aquelas dos gêneros *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Gigaspora* e *Paraglomus* (FOLLI-PEREIRA et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2012).

Estudos realizados por Wei et al. (2014), sobre a diversidade molecular de FMAs em associação com plantas *Phytolacca americana* em solos de mina contaminado com Mn, destacaram o *Glomus* e o *Rhizophagus* como espécies mais encontradas e que proporcionam melhores condições de desenvolvimento as plantas. Em solos degradados da Mata Atlântica, e considerados ácidos, foram encontradas espécies do gênero *Acaulospora*, seguido de *Glomus* e *Scutellospora*, respectivamente. Os FMAs são capazes de melhorar as condições de crescimento das plantas e imobilizar MPs em sua biomassa. As pesquisas mostram que a retenção de metais no micélio de FMAs ocorre em um processo muito rápido, mas varia conforme o metal, sendo que o Cu tem

retenção 3; 30 e 60 vezes mais rápida que a retenção do Zn, Cd e Pb, respectivamente (CABRAL et al., 2010).

3.4. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio (BFN) associadas com plantas leguminosas

A timbaúva é uma arbórea leguminosa que apresenta característica de se associar com microrganismos que proporcionam funções importantes na natureza. Seu sistema radicular possui potencial para estabelecer relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (BFN), chamadas genericamente de rizóbio. Em áreas degradadas, a perda da matéria orgânica afeta indiretamente a estrutura do solo e diretamente a disponibilidade de água e atividade biológica, dessa forma, prejudicando a ciclagem de nutrientes e o fornecimento de elementos essenciais às plantas, como o nitrogênio (N) e o fósforo (P) (FRANCO et al., 1995). De acordo com Souhie L. E. et al. (2005), eles encontraram teores maiores de N nas leguminosas como angico, sabiá e timbaúva que em eucalipto e aroeira das folhas, aos 11 e 18 meses após o transplante, em plantas inoculadas com bactérias fixadoras de N₂ atmosférico. Plantas leguminosas associadas com BFN podem dispensar, total ou parcialmente, os fertilizantes nitrogenados (BARBERI et al., 1998). As simbioses de espécies arbóreas leguminosas com micorrizas e rizóbio podem melhorar seu desenvolvimento na fase de viveiro, favorecendo seu crescimento e estabelecimento em campo e proporcionando os benefícios da incorporação de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes ao solo (PATREZE e CORDEIRO, 2004).

3.5. Efeito da mineração de carvão sobre a micorrização

A perturbação do solo causada pela atividade da mineração pode influenciar negativamente a micorriza no solo, em função de mudanças que ocorrem nas condições do solo, no tipo de propágulos fúngicos e na espécie vegetal presente (BRUNDRETT et al. 1996). Nas áreas de mineração ocorre geralmente intensa movimentação do solo, a retirada da vegetação natural e o acúmulo de grande volume de rejeitos, em alguns casos, elevando o nível de metais pesados no solo, contribuindo para o distúrbio do ecossistema (SOUZA e SILVA 1996). Estudos realizados em regiões perturbadas pela extração de carvão mineral, mostram que, em várias dessas áreas, os FMAs foram reduzidos e até eliminados (ALLEN, 1991), entretanto, um nível adequado de infectividade de FMAs é fundamental para o sucesso no processo de revegetação diversificada e na formação de ecossistema sustentável (JASPER et al., 1994). Por isso, é necessário identificar quais fungos presentes e seu grau de colonização radicular em ambientes contaminados e observar a implicação ecológica da presença ou não de FMAs sobre a seleção e a sobrevivência das plantas hospedeiras em solos contaminados (MERRYWEATHER e FITTER, 1998; GRIFFIOEN et al., 1994).

4.OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento de espécie timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) cultivada em substrato com e sem rejeito da mineração de carvão.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento e a qualidade de mudas de timbaúva em solo com e sem adição de rejeito de mineração de carvão, inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs);
- Avaliar a taxa de colonização micorrízicas de duas espécies de FMAs, número de nódulos, peso seco de nódulos e índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) em mudas de timbaúva em solo contaminado com metais pesados (MPs);
- Avaliar o teor de nutrientes (P e N) na parte aérea das mudas cultivadas em solo com e sem rejeito de mina de carvão inoculadas com FMAs.

5. HIPÓTESES

- A qualidade de mudas de espécies arbóreas aumenta quando inoculadas com FMAs em solo com rejeito de mina de carvão;
- A presença de rejeito de mineração não afeta a colonização de FMAs, número de nódulos, peso seco de nódulos e índice SPAD em mudas de timbaúva;
- A inoculação com FMAs em mudas de timbaúva cultivada em substrato com rejeito aumenta o teor de nutrientes (N e P) na matéria seca da parte aérea das plantas.

6. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades do estágio foram conduzidas de Agosto a Outubro de 2015, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato e do Doutorando Marcos Leandro dos Santos. O estágio teve como finalidade, além de aprendizagem, trazer melhor entendimento sobre a ecologia do solo, a associação de fungos e bactérias com espécies florestais, em particular, timbaúva no Laboratório de Microbiologia do Solo, Departamento de Engenharia Rural – ENR, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

As atividades foram baseadas na avaliação do crescimento da espécie arbórea cultivada em casa de vegetação em solo contaminado com metais pesados (MPs). Nesta espécie, foram testadas interações de diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e o efeito de rejeito da mineração de carvão na qualidade de muda da timbaúva cultivadas durante 90 dias.

6.1. Solo, Rejeito e Substratos utilizados no Experimento

O rejeito foi coletado em área de descarte de rejeito da mineração de carvão, no município de Criciúma (SC), onde está ocorrendo muita contaminação por MPs, oriundo da drenagem ácida de mina (DAM). O solo foi coletado em Criciúma (SC), em áreas sem presença de rejeito, a uma profundidade de 0-20 cm, depois, ambos os substratos foram secados ao ar e peneirados em malha de 4 mm para a homogeneização. Os substratos utilizados no experimento foram compostos de: solo + rejeito de mineração de carvão + areia na proporção 7:3:1 (v:v:v) e solo + areia na proporção 7:1 (v:v). O substratos foram homogeneizados em betoneira, junto com a dose de fósforo de 135 mg (superfosfato triplo) recomendada para espécies florestais (CQFS, 2004). Posteriormente, foram adicionados a tubetes de polipropileno com capacidade de 300 cm³. Os tubetes contendo os substratos foram autoclavados duas vezes por 1h em dias alternados, e depois, foram mantidos em casa de vegetação para a estabilização química durante 30 dias. Foram retirados aleatoriamente dois tubetes de cada tratamento, e seus conteúdos foram peneirados e homogeneizados para a análise física e química do substrato (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização física e química dos substratos sem rejeito (SR) e com rejeito (CR), coletados em área de mineração para a produção de mudas de timbaúva após a autoclavagem e adição da dose de fósforo recomendada.

Parâmetro	Unidade	SR	CR
Areia	g kg ⁻¹	266	352
Silte	g kg ⁻¹	455	389
Argila	g kg ⁻¹	278	258
pH (H ₂ O)	-	4,55	4,25
Índice SMP	-	4,72	4,54
Nitrogênio total	mg kg ⁻¹	0,53	0,81
Fósforo _(mehlich-1)	mg kg ⁻¹	131,58	133,67
Potássio _(mehlich-1)	mg kg ⁻¹	51,03	33,69
Cálcio	cmolc kg ⁻¹	2,70	2,63
Magnésio	cmolc kg ⁻¹	0,53	0,71
Alumínio	cmolc kg ⁻¹	6,21	5,56
Arsênio	mg kg ⁻¹	3,85	7,86
Cádmio	mg kg ⁻¹	3,97	3,55
Cromo	mg kg ⁻¹	24,92	33,38
Cobre	mg kg ⁻¹	7,66	13,21
Níquel	mg kg ⁻¹	5,96	5,67
Chumbo	mg kg ⁻¹	27,79	49,08
Zinco	mg kg ⁻¹	23,75	15,05
Manganês	mg kg ⁻¹	179,00	125,30
Carbono	%	1,94	0,58

6.2. Materiais Biológicos utilizados

Foi utilizada a espécie florestal timbaúva por ser espécie leguminosa pioneira que possui alta potencial para uso em programas de recuperação de áreas contaminadas (SILVA, et al., 2011; DELLAI, 2014). Além de ser considerada como uma espécie ornamental, sua madeira é de ótima qualidade e pode ser utilizada para fabricação de móveis após a sucessão vegetal esteja estabelecida. As sementes foram fornecidas pela Estação de Pesquisas Florestais da FEPAGRO, unidade de Santa Maria, RS. Antes do plantio, as sementes da timbaúva permaneceram por 15 minutos em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ P.A.), para a superação de dormência, conforme recomendado por Fowler e Bianchetti (2000), depois foram lavadas com água destilada para o plantio.

As espécies de fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) utilizadas foram obtidas na Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Os inóculos de *Rhizophagus clarus* e *Acaulospora colombiana* foram multiplicados em substrato composto de solo e areia coletados em Criciúma, na proporção 1:2 (v:v), previamente autoclavado duas vezes durante 1 h em dias alternados. Para a multiplicação

dos inóculos foram utilizadas 10 sementes de *Brachiaria brizantha* em vasos contendo 2,0 L de substrato, com adição de 30% de nitrogênio e uma solução nutritiva aplicada uma vez por semana (HOAGLAND e ARNON,1950). No momento do plantio foram adicionados a cada tubete 50 mL do inóculo a 5 cm de profundidade, contendo aproximadamente 200 esporos, raízes e hifas de fungos.

A estirpe de bactéria diazotrófica (*Bradyrhizobium elkanii*) utilizada foi aquela recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme a instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011. A cepa de bactéria diazotrófica isolada foi fornecida pela EMBRAPA AGROBIOLOGIA e foi multiplicada no Laboratório de Microbiologia de Solo para a produção do inóculo bacteriano, conforme recomendado por Döbereiner (1995).

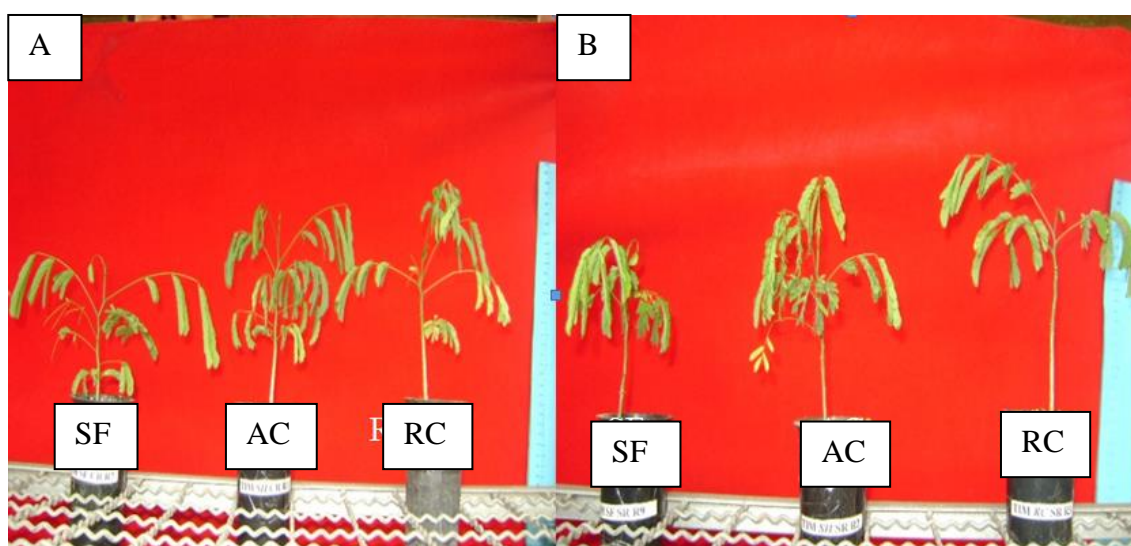
6.3. Montagem e Condução do Experimento

Foram semeadas cinco sementes por tubete e 15 dias após a semeadura foi realizado o raleio de acordo com o vigor e a fitossanidade das plântulas, deixando-se uma plântula por tubete até o fim do experimento, constituindo a unidade experimental. Após o raleio, cada plântula foi inoculada com 1 mL de suspensão de bactérias, contendo 1×10^8 células mL⁻¹. Toda semana as plantas foram irrigadas com solução Hoagland e Arnon (1950) sem adição de fósforo (P) e de nitrogênio (N). A umidade do solo foi mantida a aproximadamente 70% da capacidade de campo por meio da pesagem dos tubetes e adição de água destilada. O experimento foi composto por seis tratamentos (sem fungo, inoculado com *Rhizophagus clarus* ou com *Acaulospora colombiana*) em substrato sem e com rejeito de mineração de carvão, constituindo em experimento fatorial 3x2, com 12 repetições, totalizando 72 tubetes, em um delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante 90 dias (Figura 2).

Figura 2. Vista parcial das mudas de timbaúva na casa de vegetação aos 90 dias após a emergência.



Figura 3. Mudanças de timbaúva produzidas sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com *Acaulospora colombiana* (AC) ou *Rhizophagus clarus* (RC) sob diferentes tratamentos sem rejeito (A) e com rejeito (B) de mineração de carvão aos 90 dias.



6.4. Preparação do Tecido Vegetal para Avaliação

Aos 90 dias após a emergência, as mudas foram avaliadas considerando o seu crescimento e a sua qualidade através dos seguintes parâmetros: altura (H), diâmetro do caule (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), índice de qualidade de Dickson (IQD) conforme a fórmula (DICKSON et al., 1960): $IQD = (MSPA + MSR) / [H(cm)/DC(mm)] + [MSPA(g)/MSR(g)]$, porcentagem de colonização, número de nódulos, peso seco dos nódulos e índice de SPAD, absorção e acúmulo de N e P na parte aérea da planta.

A altura das mudas foi determinada com régua milimetrada, o diâmetro do caule com paquímetro e o índice de SPAD com clorofilômetro digital. Os nódulos das raízes foram contados e separados, secados em estufa a 60 °C e pesados em balança de precisão. Amostras de raízes foram separadas e feita a coloração para avaliação da porcentagem de colonização através da microscopia óptica (GIOVANETTI e MOSSE, 1980) (Figura 4).

Figura 4. Vista da lâmina contendo raízes de timbaúva após a coloração.



O tecido vegetal (da parte aérea e da raiz) foi secado em estufa a 60 °C para a determinação da massa seca em balança de precisão. O material (da parte aérea e da raiz) foi triturado a aproximadamente 0,5 mm, separadamente, para determinação de teores de nutrientes. Para extração de N e P as amostras foram submetidas à digestão sulfúrica conforme Tedesco et al. (1995). A determinação de N foi realizada por meio do método micro-Kjeldahl e o P em espectrofotômetro.

6.5. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade de erro, através do programa SISVAR descrito pelo Ferreira (2000). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os gráficos foram feitos com Software SigmaPlot 12.5.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A altura das plantas (H) não foi afetada nem pela inoculação com fungos micorrizicos arbusculares (FMAs), nem pela adição de rejeito ao solo, ficando com média de 12,0 cm (dados não apresentados). O diâmetro do caule (DC) aumentou com a adição de rejeito, as plantas inoculadas com *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em substrato com rejeito (CR), obtiveram maior diâmetro (Tabela 2).

Tabela 2 - Diâmetro do caule (DC); massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca da raiz (MSR); massa seca total (MST) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de timbaúva sem inoculação de fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão.

Tratamentos	SF	<i>R. clarus</i>	<i>A. Colombiana</i>
		DC (mm)	
SR	2,3 a	2,4 a	2,0 a
CR	2,9 b**	2,7 b ^{ns}	3,4 a**
CV%	16,48		
		MSPA (g)	
SR	0,56 a	0,56 a	0,44 a
CR	0,96 ab**	0,75 b ^{ns}	1,02 a**
CV%	31,88		
		MSR (g)	
SR	0,30 a	0,20 a	0,20 a
CR	0,43 ab**	0,32 b ^{ns}	0,52 a**
CV%	43,21		
		MST (g)	
SR	0,85 a	0,77 a	0,65 a
CR	1,40 a**	1,07 b**	1,54 a**
CV%	30,03		
		IQD	
SR	0,144 a	0,094 a	0,081 a
CR	0,217 b**	0,156 b**	0,285 a**
CV%	39,91		

(**) significativo ou (ns) não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, considerando o desdobramento do fator rejeito dentro do fator inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de erro, considerando o desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de rejeito.

Segundo Gonçalves et al. (2000), mudas florestais de boa qualidade devem apresentar altura entre 20 e 35 cm, e diâmetro do caule entre 5 e 10 mm. Os autores verificaram nas mudas de timbaúva cultivadas em substrato contendo 100 e 75% de areia apresentaram diâmetro do caule entre 5 e 10 mm aos 135 dias. Daniel et al. (1997) que, recomendaram, para as mudas de *Acacia mangium*, o diâmetro deve ser superior a 2 mm. Portanto, não há na literatura um padrão definido para altura e diâmetro de espécies florestais, variando com o tempo de cultivo, tipo de substrato e outras condições de crescimento.

A massa seca das plantas, tanto da parte aérea (MSPA) como da raiz (MSR) teve resultados semelhantes (Tabela 2). Verificou-se maior MSPA e MSR nas mudas inoculadas com *A. colombiana* no substrato CR, correspondendo a 1,02 g e 0,52 g, respectivamente. No tratamento sem fungo (SF) a MSPA e da MSR aumentou significativamente com a adição de rejeito no substrato. Com os resultados da MSPA e da MSR, estimou-se a massa seca total das plantas (MST), sendo que a maior média foi observada nas plantas inoculadas com *A. colombiana*, no substrato CR que, no entanto, não diferiu do tratamento SF (Tabela 2). Tal resultado sugere de que o FMA não estaria contribuindo ainda para o melhor crescimento das mudas, apenas representa um dreno de carbono para a planta hospedeira, como proposto por Nogueira e Cardoso (2000). Uma vez que a simbiose é estabelecida permite à muda capturar com mais eficiência nutrientes, especialmente fósforo (P) e água, consequentemente, o que poderia ser observada no desenvolvimento do sistema radicular, no crescimento e no desenvolvimento da parte aérea da muda (SOUZA e SILVA, 1996).

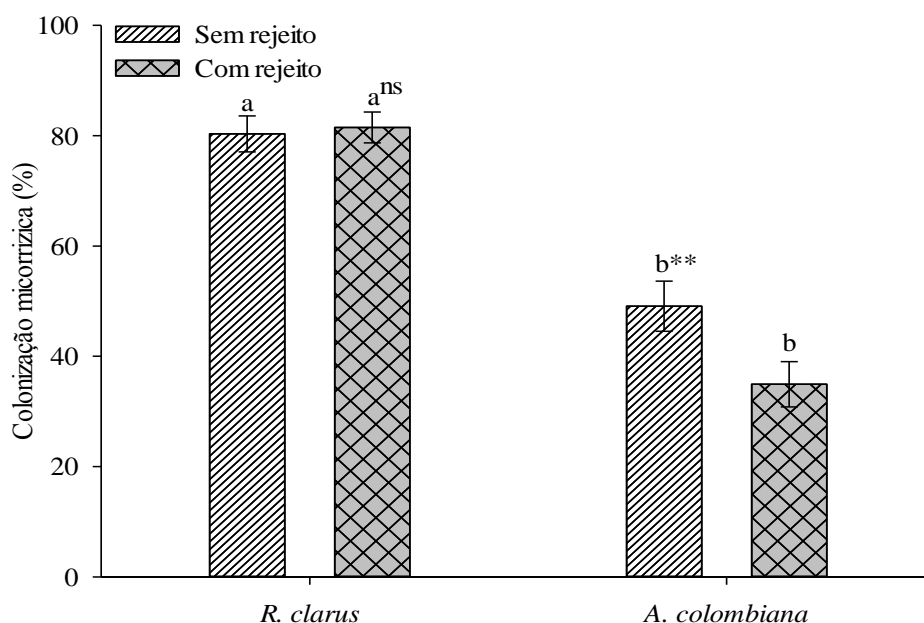
O resultado observado no índice de qualidade de Dickson (IQD) do tratamento com *A. colombiana* em substrato CR, mostra a vantagem de usar FMAs no processo da revegetação em ambiente contaminado com MPs, pois foi o que obteve melhor resultado, e esse valor diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados no tratamento SF o com fungo *R. clarus* no substrato CR, visto que esses resultados diferiram estatisticamente em relação ao tratamento sem rejeito (SR). Dessa forma, pode-se afirmar que tanto o rejeito como o fungo *A. colombiana* contribuíram na qualidade das mudas. O IQD é um indicador muito relevante, pois considera a robustez e o equilíbrio da distribuição da biomassa entre órgãos da planta, estimando resultados de vários parâmetros importantes utilizados na avaliação da qualidade de muda (FONESCA et al., 2002). Quanto maior for o IQD, melhor será a qualidade de muda, e no presente trabalho, adição de rejeito e a inoculação com *A. colombiana* contribuíram para a melhoria desse índice.

O DC e o IQD são muito importantes quando o interesse é avaliar a qualidade de mudas e a sua viabilidade de estabelecer-se no campo, uma vez

que o sucesso do plantio em grande escala de espécies arbóreas depende da produção de mudas com qualidade, assegurando sua sobrevivência e seu estabelecimento no campo (SCHIAVO et al., 2009). Variáveis como MSPA e da MSR também são relevantes, porque, o plantio de mudas com parte aérea e sistema radicular bem formado e em bom estado nutricional pode promover maior taxa de sobrevivência e de crescimento no campo, além de aumentar o poder competitivo da espécie de interesse com a vegetação espontânea, e com isso pode-se diminuir a frequência de manejo (FONSECA, 2005).

Através desses resultados, pode-se evidenciar de que o melhor desempenho do fungo *Acaulospora colombiana* foi influenciada pela dose de 30% de rejeito de mina de carvão no crescimento de mudas da espécie de timbaúva promovendo uma melhor resposta em relação ao fungo *Rhizophagus clarus* nessas condições do experimento. Esse resultado é muito interessante quando a intenção é utilizar microrganismos simbióticos na técnica de fitorremediação em programas de recuperação de áreas contaminadas, pois permite selecionar espécies de fungo ou bactéria que trazem melhores benefícios em associação com espécies vegetais de interesse, proporcionando melhor eficiência desta técnica. Em programas de recuperação de solos contaminados, é necessário avaliar a associação de espécie vegetal de interesse com o isolado fúngico, assim como, suas respectivas combinações com as características locais, fatores limitantes do meio e dos diferentes comportamentos (COUTINHO e BARBOSA, 2007; PRALON e MARTINS, 2001). Na porcentagem da colonização micorriza foi evidenciado a maior taxa da micorrização no tratamento inoculado com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) tanto em substrato sem e com rejeito (Figura 5).

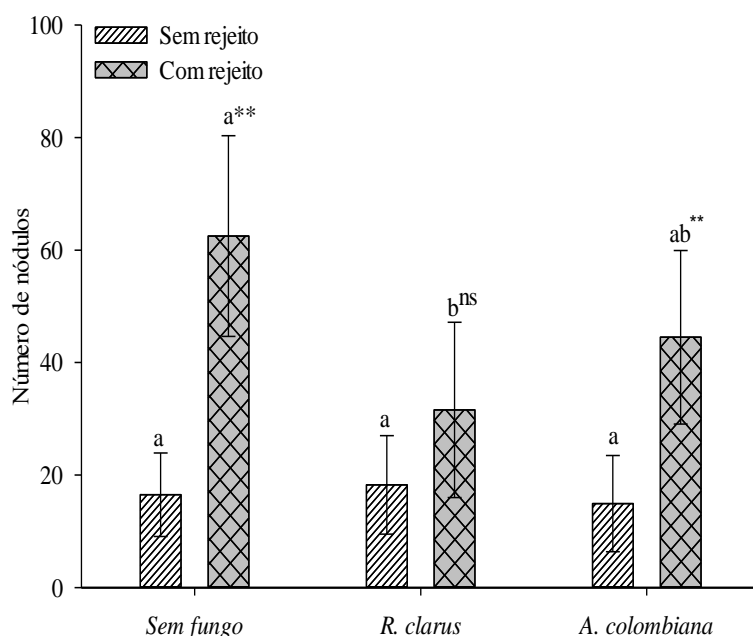
Figura 5. Porcentagem da colonização micorrizica em mudas de timbaúva inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.



(**) significativo ou (ns) não significativo pelo teste tukey a 5% de probabilidade de erro, considerando o desdobramento do fator rejeito dentro do fator inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste tukey a 5 % de erro, considerando o desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de rejeito.

Neste mesmo tratamento foi observado também maior teor de P na parte aérea em relação aos demais tratamentos, em substrato com rejeito, mostrando o efeito benéfico do fungo no fornecimento de P às plantas (Tabela 3). As plantas inoculadas com *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) apresentaram maior porcentagem da micorrização no substrato sem rejeito (Figura 5). Este resultado pode estar relacionado ao maior estresse das mudas na ausência de rejeito, o que levou a maior dependência micorrízica das mudas, ou maior responsividade, como relatado por Moreira et al. (2006). O rejeito pode contribuir para estabilizar MPs presentes no meio e, ao mesmo tempo, melhorar a característica física, particularmente, a porosidade do substrato (Tabela 1). Assim, foi evidenciada maior intensidade na simbiose entre a espécie hospedeira timbaúva e o fungo *A. colombiana* na ausência do rejeito. Os tratamentos inoculados com *R. clarus*, não diferiram entre si e foram os que tiveram maior porcentagem da micorrização em relação aos demais tratamentos. O maior número de nódulos foi obtido no tratamento sem fungo no substrato com rejeito (Figura 6).

Figura 6. Número de nódulos em mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.

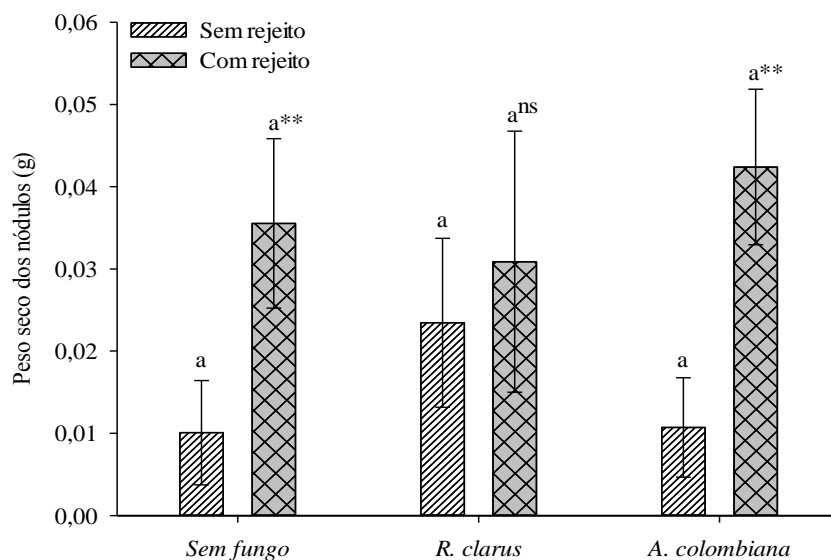


(**) significativo ou (ns) não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, considerando o desdobramento do fator rejeito dentro do fator inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de erro, considerando o desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de rejeito.

Este fato deve relacionar-se às alterações metabólicas das células radiculares e das bactérias, que acarretam prejuízos ao desenvolvimento da estrutura simbiótica nos tratamentos com dupla inoculação (ANJOS et al., 2011), uma vez que todos os tratamentos foram inoculados com a bactéria diazotrófica. O segundo maior valor ocorreu nas mudas inoculadas com *A. colombiana*, também no substrato com rejeito. De modo geral, podemos concluir que o rejeito, o fungo e a bactéria contribuíram na nodulação para o melhor estabelecimento e qualidade das mudas.

No peso seco dos nódulos, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos inoculados com *A. colombiana* e o sem fungo respectivamente, porém não diferiram estatisticamente das plantas inoculadas com *R. clarus*, na presença de rejeito (Figura 7).

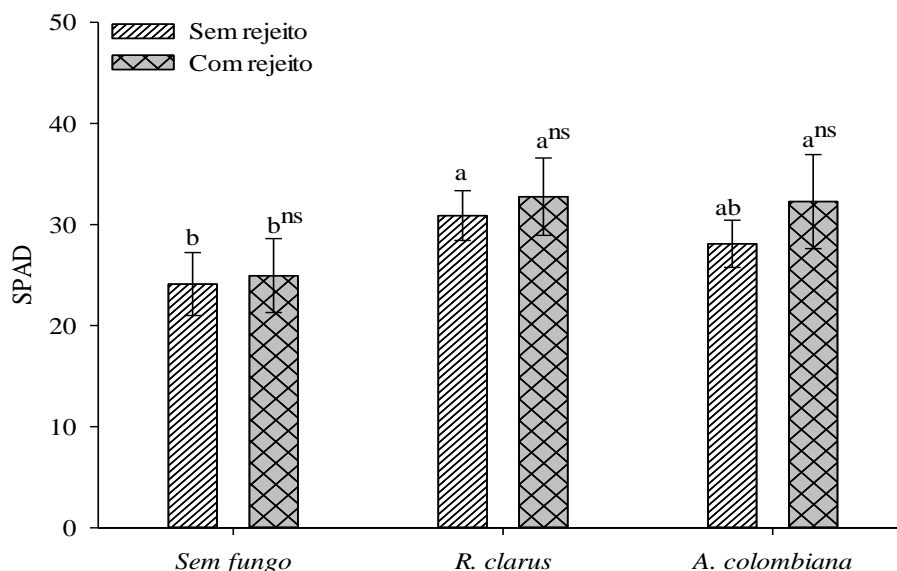
Figura 7. Peso seco dos nódulos em mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.



(**) significativo ou (ns) não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, considerando o desdobramento do fator rejeito dentro do fator inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de erro, considerando o desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de rejeito.

Entretanto, o peso seco dos nódulos não diferiu entre tratamento inoculado com *R. clarus*, nos substratos sem rejeito e com rejeito. Foi observada predominância do fungo *R. clarus* sobre a bactéria, pois a taxa de micorrização aumentou muito, enquanto, o número de nódulos foi o mais baixo no tratamento com rejeito. O tratamento inoculado com *R. clarus* obteve menor número de nódulos e menor massa seca total, portanto, foi observado no índice de SPAD valores iguais ao tratamento com fungo *A. colombiana* no substrato com rejeito e esses valores diferiram estatisticamente do tratamento sem fungo (Figura 8).

Figura 8. Índice SPAD de mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas aos 90 dias.



(**) significativo ou (ns) não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, considerando o desdobramento do fator rejeito dentro do fator inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de erro, considerando o desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de rejeito.

Este resultado pode-se sugerir que em substrato com rejeito, a dupla inoculação do fungo e da bactéria proporcionou maior aporte de nitrogênio para as plantas (Tabela 3). O índice SPAD é altamente correlacionado com o teor de clorofila na folha, com isso, é capaz de identificar deficiência de nitrogênio (N) e onde é necessária a aplicação desse nutriente nas plantas (MARKWELL et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999).

Diante desses resultados obtidos, a melhor resposta das mudas de timbaúva aos tratamentos aplicados, quanto a qualidade e o estado nutricional, foi obtida pela combinação entre FMAs, bactéria diazotrófica e rejeito (30%) (Tabela 3), pois avaliando os teores de N na MSPA das mudas, observou-se que as plantas inoculadas com fungo *A. colombiana* na presença de rejeito obtiveram maior resultado, o qual diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Esse resultado pode ser relacionado ao índice SPAD (Figura 8) e peso seco de nódulos (Figura 7), conferindo o melhor índice de qualidade das mudas (Tabela 2).

Tabela 3. Teores de N, P na massa seca da parte aérea (MSPA) de mudas de timbaúva sem inoculação com fungo (SF) e inoculadas com *Rhizophagus clarus* (*R. clarus*) ou *Acaulospora colombiana* (*A. colombiana*) em solo sem rejeito (SR) e com rejeito (CR) de mineração de carvão, coletadas 90 dias.

Nutrientes		SF		<i>R.clarus</i>		<i>A.colombiana</i>	
N (g kg ⁻¹)	SR	14,48	A	14,48	A	6,65	b
	CR	17,67	b ^{ns}	20,47	b ^{ns}	30,49	a ^{**}
	CV%	24,01					
P (g kg ⁻¹)	SR	6,62	a ^{ns}	8,41	A	7,99	a ^{**}
	CR	5,77	B	11,73	a ^{**}	5,92	b
	CV (%)	16,33					

(**) significativo ou (ns) não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, considerando o desdobramento do fator rejeito dentro do fator inoculação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de erro, considerando o desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de rejeito.

O segundo maior valor foi obtido no tratamento inoculado com fungo *R. clarus*, apesar de não diferir estatisticamente do tratamento SF no substrato com rejeito (Tabela 3). Estes resultados corroboram o resultado obtido no índice SPAD, pois foram os mesmos em que obtiveram maior índice de SPAD (Figura 8). A absorção e acúmulo de nitrogênio (N) e fósforo (P) variaram em função dos tratamentos aplicados. Os teores de N não diferiram entre os tratamentos SF e com fungo *R. clarus*, em ambos os substratos.

O maior teor de P foi observado no tratamento inoculado com *R. clarus* no substrato com rejeito, e este valor diferiu estatisticamente dos outros tratamentos contendo rejeito (Tabela 3). Esse resultado pode estar relacionado com a maior porcentagem de colonização micorrízica (Figura 5). A associação micorrízica promove benefícios consideráveis para o crescimento e na absorção de nutrientes, especialmente o P (GOSLING et al., 2006). No presente trabalho, essa contribuição só foi observada em plantas micorrizadas com fungo *R. clarus*, na absorção do P. No entanto, o aporte de P observado neste tratamento não influenciou na MSPA, na MSR, no DC e no IQD (Tabela 2). A adição de rejeito no tratamento inoculado com *A. colombiana* diminuiu o teor de P na parte aérea, o que corrobora o resultado obtido na porcentagem de colonização micorrízica deste tratamento, que foi maior no substrato sem rejeito. Segundo Andrade et al. (2003), a redução do teor de P na parte aérea de plantas micorrizadas deve-se à redução da eficiência da micorrização, o que foi observado no presente trabalho.

Observou-se ainda influência da inoculação com o fungo *A. colombiana* no aumento da MSPA e da MSR, bem como no DC (Tabela 2). No entanto, a H das mudas não foi influenciada pela associação micorrízica. Embora estejam comprovados os benefícios da micorrização para a planta hospedeira, eles

dependem da espécie de fungo e da planta envolvidas na associação e com as condições do meio de crescimento como foi observado no presente trabalho. O número de nódulos mostra um aumento significativo na intensidade da simbiose entre a bactéria e a planta na presença de rejeito, especialmente no tratamento sem fungo, e, em seguida, no tratamento inoculado com *A. colombiana*. O peso seco dos nódulos indica também aumento da simbiose quando se comparam os tratamentos sem e com rejeito, com exceção do tratamento inoculado com *R. clarus* no qual a simbiose não aumentou com a presença de rejeito. O aumento da nodulação na presença de rejeito possivelmente deve-se ao fato de que o rejeito estabilize MPs, consequentemente as bactérias não foram afetadas diretamente pela presença de MPs. Existem relatos que mostram a presença de MPs pode diminuir a colonização micorrízica, como verificado por Rabie (2005a) nas culturas de trigo e feijão em solo contaminado com Zn, Cu, Pb e Cd, no presente estudo esse resultado só foi verificado em plantas inoculadas com *A. colombiana*.

8. CONCLUSÃO

A associação com *Acaulospora colombiana* aumentou a qualidade das mudas de timbaúva em substrato com rejeito de mineração;

Apesar de ter reduzido a taxa de colonização micorrízica, principalmente pelo fungo *Acaulospora colombiana*, a presença do rejeito aumentou o número de nódulos e o peso seco de nódulos nas plantas;

A inoculação com o fungo *Acaulospora colombiana* aumentou o teor de N na parte aérea das plantas e a inoculação com *Rhizophagus clarus* obteve maior teor de P na presença de rejeito de mineração de carvão.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é uma estratégia eficiente no incremento da biomassa vegetal. Porém, é importante conhecer os fatores que interferem no processo de interações de micro-organismos dentro do sistema solo-planta-atmosfera. As atividades realizadas através deste estágio contribuíram de forma significativa para o meu crescimento pessoal e profissional, por me proporcionar mais prática e capacitação, especialmente nas pesquisas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, M.F. 1991. **The ecology of mycorrhizae**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Alloway, B.J. **Heavy metals in soils**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1990.
- Alkorta, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J.M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. (2004). **Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic**. Review Environment Science Biotechnology, 3:71-90.
- AMARAL SOBRINHO, N M. B. **Interação dos metais pesados de resíduos siderúrgicos com um solo podzólico vermelho-amarelo**. 1993. 163p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) –Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Andrade, S. A. L. et al. **Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations**. Environmental & Experimental Botany, v.68, p.198-207, 2009.
- Andrade, S.A.L.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F. & SILVEIRA, A.P.D. **Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja**. R. Bras. Ci. Solo, 27:945-954, 2003.
- Anjos et al., R. Bras. Ci. **Solo**, 35:1441-1451, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v35n4/a38v35n4.pdf> . Acesso em 18 de novembro de 2015.
- Antoniolli, Z. I.; SILVA, R. F.; SAIDELLES, F., SALLES, A. S.; ZINI, R.O.; LEAL, L. T.; LUPATINI, M.; MORO C.A.J. **Comportamento de Quatro Espécies Florestais Nativas em Solo Contaminado por Cobre**. 2007. Disponível em: http://w3.ufsm.br/ppgcs/congressos/CBCS_Gramado/Arquivos%20trabalhos/Comportamento%20de%20Quatro%20Esp%20E9cies%20Florestais_Zaida%20A..pdf . Acesso em 15 de novembro 2015.
- Barberi, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais**. Cerne, v.4, n.1, p.145-153, 1998..
- Bellgard, S.E. 1991. **Mycorrhizal associations of plant species in Hawkesbury Sandstone vegetation**. Australian Journal of Botany 39:357-364.
- Binotto, R.B.; TEIXEIRA E.C.; SÁNCHEZ, J.C.D.; NAMMI, A.S.; FERNANDES, I.D.; MIGLIAVACA, D.M. (1999). **Avaliação ambiental da Região do Baixo**

Jacuí: localização, descrição e caracterização dos resíduos provenientes das atividades de processamento de carvão. Porto Alegre: FEPAM/CIENTEC. 40P.

Biondi, C. M. **Teores Naturais de Metais Pesados nos Solos de Referência do Estado de Pernambuco.** 2010, 67f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciências do Solo) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Brundrett, M.C., ASHWATH, N. & JASPER, D.A. 1996. **Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia.** II. Propagules of mycorrhizal fungi in disturbed habitats. Plant and Soil 184:173-184.

Burak, D.L.; FONTES, M.P.F.; SANTOS, N.T.; MONTEIRO, L.V.S.; MARTINS, E.S.; BECQUER, T. **Geochemistry and spatial distribution of heavy metals in Oxisols in a mineralized region of the Brazilian Central Plateau.** Geoderma, v.160,p.131-142, 2010.

Cabral et al., **Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares.** Quím. Nova vol.33 no.1 São Paulo 2010.

Cetesb – **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. DOROTHY C.P. CASARINI et al., São Paulo: CETESB, 2001. 73p. (Série Relatórios Ambientais).

Colodete, C.M.; Dobbss, L.B.; Ramos, A.G. **Aplicação de micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas.** Natureza on line, v.12, p.31-37, 2014.

Coutinho, H. D.; BARBOSA, AL. R. **Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização.** Silva Lusitana, Lisboa, v. 15, n. 1, p. 103 – 117. 2007.

Costa, M.S.; Alves, S.M.C.; Ferreira Neto, M.; Batista, R.O.; Costa, L.L.B.; Oliveira, W.M. **Produção de mudas de timbaúva sob diferentes concentrações de efluente domestic tratado.** Irriga, edição especial, p.408-422, 2012.

CQSF (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO). **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** Porto Alegre: SBSCS-Núcleo Regional Sul, 2004. 410p.

Cunningham, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. **Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants.** Adv. Agron., v. 56, p. 55-114, 1996.

Daniel, O.; VITORINO, A. C. T.; ALOISI, A. A.; MAZZOCHIN, L.; TOKURA, A. M.; PINHEIRO, E. R.; SOUZA, E. F. **Aplicação de fósforo em mudas de *Acacia mangium***. Revista Árvore, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 163-168, 1997.

Dellai, A. **Phisolitus microcarpus e óleo essencial em três espécies nativas em solo contaminado com cobre**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS, 2014.

Dickson, A. et al. **Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries**. Forest Chronicle, v.36, n.1, p.10-13, 1960.

DNPM -DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. **Sumário Mineral**. v.32, Brasília, 2012.

Döbereiner, J. **Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants**. In: Alef, K.; Nannieri, P. (Ed.). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. London: Academic, 1995. p.134-141.

Fadigas, F.S.; SOBRINHO, N.M.B.A.; MAZUR, N.; ANJOS, L.H.C. & FREIXO, A.A. **Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros**. Bragantia, 61:151-159, 2002.

Ferreira, D.F. **Programa Sisvar.exe: sistema de análise de variância**. Lavras: Ufla, 2000.

Folli-Pereira, M.S.; Meira-Haddad, L.S.M.; Bazzolli, D.M.S.; Kasuya, M.C.M. **Micorrizas arbusculares e tolerância das plantas ao estresse**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.36, p.1663-1679, 2012.

Fonseca, E.P. et al. **Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento**. Revista Árvore, v.26, n.4, p.515-523, 2002.

Fonseca, F. de. A. **Produção de mudas de *Acacia mangium* Wild. E *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula, em diferentes recipientes, utilizando compostos de resíduos urbanos, para a recuperação de áreas degradadas**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Fowler, J. A. P.; Bianchetti, A. **Dormência em sementes florestais**. Documentos 40, Embrapa, Colombo, PR, 2000.

Franco, A.A.; DIAS, L.E.; FARIA, S.M. de.; CAMPELLO, E.F.C.; SILVA, E.M.R. da. **Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico**. Oecologia Brasiliensis, v. 1, p. 459-467, 1995.

Giller, K.E.; WITTER, E. & MCGRATH, S.P. **Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review.** Soil Biol. Biochem., 30:1389- 1414, 1998.

Giovannetti, M., Mosse, B. **An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots.** New Phytologist, v.84, p.484-500, 1980.

Gonçalves, J. M.; SANTERELLI, E. G.; MORAES NETO, S. P. MANARA, M. P. **Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização.** IN: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. (Eds.). Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba: ESALQ/USP, 2000. P. 309-350.

Gosling, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G. & BENDING, G.D. **Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming.** Agric. Ecosyst. Environ., 113:17-35, 2006

Gratão, P.L.; PRASAD. M.N.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2005). **Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment.** Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 53-64.

Grazziotti, P. H.; Siqueira, J. O; Moreira, F. M. S. **Espécies arbóreas e ectomicorizas em relação ao excesso de metais pesados.** Tópicos em Ciência do Solo, v.5, p.55-105. 2003.

Griffioen, W.A.J., IETSWAART, J.H. & ERNST, W.H.O. 1994. **Mycorrhizal infection of an agrostis-capillaris population on a copper contaminated soil.** Plant and Soil 158:83-89.

Guimarães. T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V., V.H.; MONNERAT, P.H. **Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo.** *Bragantia*, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 209-216, 1999.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkeley: California Agriculture Exp. Station, 1950. 32p.

Jasper, D.A., ABBOT, L.K. & ROBSON, A.D. 1994. **Soil disturbance in native ecosystems - The decline and recovery of infectivity of VA mycorrhizal fungi.** In Mycorrhizas in ecosystems. (D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter & I.J. Alexander, eds.). CAB International, Cambridge, p.151-155.

Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS e Hayes WJ (2000) **Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation.** Chemosphere. 41: 197-207.

- Kistner C e Parniske M (2002) **Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis**. Trends in Plant Science. 7: 511-518.
- Lasat, M.M. (2002). **Phytoextraction of toxic metais: a review of biological mechanisms**. Journal of Environmental Quality, 31: 109-120.
- Locateli, L. M.; Vitovski, C.A.; Lovato, P.E. **Sistema radicular de porta-enxertos micropropagados de macieira colonizados com fungos micorrízicos arbusculares**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.37, p.1239-1246, 2002.
- Lu, A.; WANG, J.; QIN, X.; WANG, K.; HAN, P.; ZHANG, S. **Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and origin of heavy metals in the agricultural soils in Shunyi, Beijing, China**. Science of the Total Environment, v. 425, p. 66–74, 2012a.
- Marques, M.; Aguiar, C.R.C.; Silva, J.J.L.S. **Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.35, p.1-11, 2011.
- Markwell, J.; OSTERMAN, J.C.; MITCHELL, J.L. **Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter**. Photosynthesis Research, v. 46, p. 467-472, 1995.
- Matos, A. T. et al. **Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils**. Environmental Pollution, Oxford, v.111, p.429-435, 2001.
- Merryweather, J.W. & FITTER, A. 1998. **The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta***. II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations. New Phytologist 138:131-142.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras, UFLA, 2006.729p.
- Moreira, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. v.1. 625p.
- Mugouei, R.; Borghei, M.; Arjmandi, R. **Phytoremediation of stable Cs from solutions by *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* and *Chenopodium album***. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.74, p.2036-2039, 2011.
- Nascimento, F. M. F. **Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em Santa Catarina**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MINA A CÉU ABERTO, 1.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MINA SUBTERRÂNEA, 2., Belo Horizonte, 2002. Resumos...Belo Horizonte, 2002.

- Nogueira, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. **Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.24, p.329-338, 2000.
- Patreze, C.M.; CORDEIRO, L. **Nitrogen-fixing and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae.** Forest Ecology and Management, Wageningen, v.196, p.275-285, 2004.
- Pereira, A. C. C. et al. **Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada.** Revista Ciência Agronômica, v. 43, p. 641-647, 2012.
- Pierznski, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soil and Environmental Quality.** p. 331-361, 2005.
- Pralon, A. Z.; MARTINS, M. A. **Utilização do resíduo industrial Ferkal na produção de mudas de Mimosa caelsalpinifolia, em estéril de extração de argila, inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e rizóbio.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 55-63. 2001.
- Prasad, M.N.V.; MALEC, P.; WALOSZEK, A.; BOJKO, M.; STRZALKA, K. (2001). **Physiological responses of Lemma trisulca L. (Duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation.** Plant Science, 161: 881-889.
- Punshon, T.; Dickinson, N. M.; Leep, N. W. **The potential of Salix clones for bioremediating metal polluted soil.** In: Glimmerveen I, editor. Heavy metals and trees. Proceedings of a Discussion Meeting. Glasgow. Edinburgh: Institute of Chartered Foresters; p. 93-104, 1996.
- Rabie, G.H. **Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil.** African J. Biotechnol., 4:332-345, 2005a.
- Raskin, I.; BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D. (1997). **Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents.** Environmental Science and Technology, 31:860-865.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. **Biologia vegetal.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. 728p.
- Salt, D.E.; RAUSER, W.E. (1995). **MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots.** Plant Physiology, 107: 1293-1301.
- Salt, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. (1998) **Phytoremediation: Annual Review Plant Physiology of Plant and Molecular Biology**, 49: 643-668.

Santos LC (2006) **Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, associação ectomicorrízica e no desenvolvimento de mudas de Eucalipto e Canafístula**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências do Solo, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

Santibáñez, C. et al. **Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne***. Science of Total Environment, v. 395, v.1, p. 1-1), 2008.

Schiavo, J. A.; MARTINS, M.A.; RODRIGUES, L.A. **Avaliação nutricional de mudas de *Acacia mangium*, *Sesbania virgata* e *Eucalyptus camaldulensis* inoculadas com fungos micorrízicos, em casa-de-vegetação e em cava de extração de argila**. Acta Scientiarum Agronomy, v. 31, n. 4, p. 701-707, 2009.

Schneider, J.; Oliveira, L.M.; Guilherme, L.R.M.; Stürmer, S.L.; Soares, C.R.F.S. **Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio**. Química Nova, v.35, p.709-714, 2012.

Silva, L. F. O. et al. **Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage**. Science of the Total Environmental, v.447, p.169-178, 2013.

Silva, R.F.; Antonioli, Z.I.; Lupatini, M.; Trindade, L.L. **Ectomicorrização em quatro espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul e sua eficiência em solo contaminado com cobre**. Ciência e Natura, v.33, p.99-109, 2011.

Souza, F.A. & SILVA, E.M.R. 1996. **Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas**. In Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas (J.O. Siqueira, ed.). UFLA/DCS e DCF, Lavras, p.255-290.

Smith SE e Read DJ (1997) **Mycorrhizal symbiosis**. Biologia Plantarum. 40: 154-154.

Smith, S.E. & Read, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3.ed. London, Academic Press, 2008. 785p.

Soares, C.R.F.S.; ACCIOLY, A.M.A.; MARQUES, T.C.L.L.S.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. **Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caules e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco**. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.13, p.302-315, 2001.

Souchie, E. L.; Cristiana do Couto Miranda; Eduardo Francia Carneiro Campello; Eliane M. Ribeiro da Silva; Orivaldo José Saggin-Júnior. **Enriquecimento de capoeira com espécies arbóreas na região da mata atlântica**. v.12, n.1, p. 01 - 06, 2005.

Souza, F.A. & SILVA, E.M.R. 1996. **Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas.** In Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas (J.O. Siqueira, ed.). UFLA/DCS e DCF, Lavras, p.255-290.

Souza VC, Silva RA, Cardoso GD e Barreto AF (2006) **Estudos sobre fungos micorrízicos.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 10: 612-618.

STEVENSON, F.J., COLE, M.A. **Micronutrients and toxic metals.** In: STEVENSON, F.J., COLE, M.A. Cycles of soil. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. p. 371 – 414.

Tedesco, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais.** 2 ed. Porto Alegre, UFRGS, 1995. 174p.

Trannin, I.C.B.; Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. **Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contorsiliquum* e *Sesbania virgate* em solo contaminado com metais pesados.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.25, p.743-753, 2001.

Vega, F. A.; COVELO, E. F.; CERQUEIRA, B. & ANDRADE, M. L. **Enrichment of marsh soils with heavy metals by effect of anthropic pollution.** J. Hazard. Mater., 170:1056-1063, 2009.

Wei, Y.; Hou, H.; Li, J.; ShanGuan, Y.; Zhang, J.; Zhao, L.; Wang, W. **Molecular diversity of arbuscular micorrhizal fungi associated with na Mn hiperaccumulator – *Phytolacca americana*, in Mn mining área.** Appleid Soil Ecology, v.82, p.11-17, 2014.

Wheeler W (1994) **Site Remediation: An Australian perspective on best practice.** In: Cole J (Ed) Environmental Management Industry Association of Australia Year Book. Waterloo: Executive Media Pty. Ltd. pp 156-160.

Wong, M. W. **Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils.** Chemosphere, v.50, p.775-780, 2003;

Zhao, F.J.; MCGRANT, S.P.; MERRINGTON. **Estimates of ambient background concentrations of trace metals in soil for risk assessment.** Environmental Pollution, v. 148, p. 221-229, 2007.